

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 894**

51 Int. Cl.:

C12N 9/00 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

C12P 13/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.12.2010 PCT/KR2010/009521**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.07.2011 WO11083933**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.12.2010 E 10842313 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.03.2018 EP 2522720**

54 Título: **Cepa mutante para producir L-ornitina o L-arginina, y procedimiento de producción de la misma**

30 Prioridad:

06.01.2010 KR 20100000726

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

18.06.2018

73 Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORP. (100.0%)
CJ Building 500, Namdaemunno 5-ga Jung-gu
Seoul 100-749, KR**

72 Inventor/es:

**CHO, JIN-MAN;
KIM, HYE-WON;
LEE, JI-HYE y
CHO, JAE-YONG**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 672 894 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Cepa mutante para producir L-ornitina o L-arginina, y procedimiento de producción de la misma

5

Campo técnico

La presente invención se refiere a una variante de *Corynebacterium* productora de L-ornitina y L-arginina y un procedimiento para la producción de L-ornitina y L-arginina. Más especialmente, la presente invención se refiere a un polinucleótido derivado de *Corynebacterium glutamicum* que codifica tanto acetilglutamato sintasa como acetilornitinasas que se involucran en la biosíntesis de ornitina o arginina, a un polipéptido codificado por el polinucleótido, a un vector recombinante que transporta el polinucleótido, a un transformante preparado mediante la introducción del vector recombinante en un organismo huésped que produce L-arginina, y a un procedimiento para producir L-ornitina o L-arginina mediante el cultivo del transformante.

10

15

Técnica anterior

Los L-aminoácidos se usan como ingredientes en los medicamentos para seres humanos y se aplican especialmente en la industria farmacéutica y la industria alimenticia y se usan, además, como nutrientes para animales. Entre los L-aminoácidos, la L-ornitina, uno de los productos en el ciclo de la arginina, se conoce como un componente medicinal que aumenta la función hepática (Salvatore et. al. 1964). La L-arginina se encuentra en abundancia como una forma libre en semillas de plantas y ajo y se usa como un complemento nutritivo en productos medicinales o alimenticios. Entre los ejemplos de las aplicaciones medicinales de la L-arginina se incluyen las sustancias antihepatotóxicas, potenciadores metabólicos cerebrales, terapéuticos para infertilidad masculina, y formulaciones de aminoácidos generales. Los representantes entre los alimentos en los que se aplica la L-arginina incluyen los aditivos de pasta de pescado, aditivos de bebidas saludables y alternativas de la sal para pacientes con hipertensión.

20

25

La fermentación se aplica cuando la bacteria corineforme (en especial, *Corynebacterium glutamicum*) se usa en la producción masiva de aminoácidos. Debido a la gran importancia de esta en lo referido a la industria, el procedimiento de producción bacterial de aminoácidos se mejora continuamente. Las mejoras metodológicas se han alcanzado con respecto a, por ejemplo, agitación, introducción de oxígeno, y el mantenimiento de la concentración de azúcar durante la fermentación.

30

35

Con el fin de aumentar la productividad microbiana de los aminoácidos, la selección de microbios adecuados resulta muy importante. Se pueden seleccionar los L-aminoácidos productores de cepas que son resistentes a sustancias antimetabolito o auxotróficas para metabolitos responsables de la regulación de aminoácidos. Por ejemplo, variantes de *Brevibacterium* o *Corynebacterium* spp. que producen glutamato se usan para producir ornitina (EP 0 393 708 A3). Además, variantes de *Brevibacterium* o *Corynebacterium* spp. productoras de glutamato se usan para producir, en forma directa, L-arginina a partir de fuentes de carbono y nitrógeno (Publicación de Patente Japonesa NOs. Sho. 57-163487, 60-83593 y 62-265988).

40

El documento EP 1 108 790 A2 divulga la SEQ ID NO 5168 en la página 124 y las reivindicaciones 16, 17, la cual se identifica en un 100 % con respecto a la SEQ ID No: 1 de la presente invención. Sin embargo, el documento EP 790 solo enseña que la SEQ. ID NO 5186 tiene actividad de puomicina N-acetiltransferasa.

45

El documento WO 2007/113127 divulga una secuencia que se identifica en un 100 % en una superposición en común con la SEQ ID No: 1 de la presente invención. Sin embargo, el documento WO 127 solo enseña que dicha proteína respectiva tiene actividad de acetiltransferasa.

50

La entrada Q8NQB1 de UNIPROT se refiere a la secuencia YP_225811 que se identifica en un 100 % en una superposición en común con la SEQ ID No: 1 de la presente invención. En dicha entrada, la funcionalidad se describe como N-acetiltransferasa.

55

La tecnología de ADN recombinante constituye también una herramienta útil mediante la cual las cepas corineformes productoras de L-aminoácidos pueden modificarse genéticamente para potenciar las funciones que se asocian con la producción de L-aminoácidos. Por ejemplo, *argCJBD*, un gen para biosíntesis de ornitina, puede introducirse en y sobreexpresarse en una cepa que resulta incapaz de sintetizar arginina y prolina (Hwang et al., 2008). Además, una cepa puede ser recombinada genéticamente para inactivar *argR*, un gen represor de la expresión del operón de biosíntesis de la arginina (Publicación de Solicitud de Patente U.S. No. 2002/0045223A1).

60

Un aumento en la productividad de aminoácido puede lograrse mediante el refuerzo de la biosíntesis de genes de interés. Un informe muestra que el rendimiento de la producción de aminoácidos puede mejorarse al aumentar la expresión de genes de biosíntesis. Por ejemplo, la sobreexpresión del gen de biosíntesis de arginina *argF* conduce a una producción en aumento de arginina (Solicitud de Patente Coreana No. 10-2004-107215).

65

De manera adicional, se divulga un procedimiento para producir L-arginina en el que el gen *argD2* (Ncgl2355) o (Ncgl0990), un gen putativo de acetilornitina aminotransferasa que se involucra en la biosíntesis de arginina de *Corynebacterium glutamicum*, se sobreexpresa para producir L-arginina de alto rendimiento (Patentes Coreanas Nos. 0830289 and 0830290).

De manera similar, las cepas microbianas capaces de producir ornitina o arginina de alto rendimiento pueden resultar a partir del refuerzo de genes de biosíntesis, en especial genes de las enzimas de biosíntesis acetilglutamato sintasa y acetilornitinasas.

Sin embargo, la acetilglutamato sintasa no se ha encontrado en ninguna del *Corynebacterium spp.*, según se conoce hasta ahora. En esta invención, la presente invención examinó un gen que codifica una enzima responsable de la función de acetilglutamato sintasa. Se informó que el polipéptido del gen tiene una actividad similar a la de la acetilornitinasas que se codifica mediante *argJ*. Además, se encontró un aumento de la actividad del gen para aumentar la concentración de ornitina o arginina. En base a estos resultados de investigación, se logró la presente invención.

Divulgación

Problema técnico

Por lo tanto, un objeto de la presente invención se refiere a la provisión de un polinucleótido derivado de *Corynebacterium* nuevo para codificar un polipéptido que tiene actividad de acetilglutamato sintasa o de acetilornitinasas, o el polipéptido que se codifica de ese modo.

Otro objeto de la presente invención se refiere a la provisión de una cepa en la que el gen se sobreexpresa y que ha aumentado la productividad para la ornitina o arginina.

Otro objeto adicional de la presente invención se refiere a la provisión de un procedimiento para producir ornitina o arginina en altas concentraciones usando la cepa.

Solución técnica

De acuerdo con un aspecto de esta, la presente invención proporciona el uso de un polipéptido derivado de *Corynebacterium glutamicum* que muestra actividad de acetilglutamato sintasa y actividad de acetilornitinasas para producir L-ornitina y L-arginina.

En la presente invención, el gen Ncgl1469, cuya secuencia se encuentra disponible de manera pública mediante la base de datos del "National Institute of Health", se encontró para codificar tanto acetilglutamato sintasa como acetilornitinasas. En *Corynebacterium spp.*, el gen que codifica acetilglutamato no ha sido determinado todavía mientras que se informó que la acetilornitinasas se codificaba a partir del *argJ* (Sakayan et al., 1996). Ningún documento anterior con respecto a la presente invención divulgó que el gen Ncgl1469 codifica las dos enzimas. Sus secuencias de aminoácidos y nucleótidos se proporcionan como SEQ ID NOS. 1 y 2, respectivamente.

De acuerdo con otro aspecto de esta, la presente invención proporciona el uso de un vector que transporta un gen que codifica tanto la actividad de acetilglutamato sintasa como la actividad de acetilornitinasas para producir L-ornitina y L-arginina. El vector contiene un gen de acetilglutamato sintasa y de acetilornitinasas. Entre los ejemplos de los plásmidos útiles como el vector de la presente invención, se incluyen pZ1 (Menkel et al), pEkEx1 (Eikmarms et al), pHS2-1 (Sonnen et al), pCG4 (Patente U.S. N°. 4,489,190), pNG2 (Serwold-Davis et al) o pEKO (Eikmanns et al), con preferencia por pEKO. Más preferiblemente, el vector contiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 1 o la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 2 y se muestra en la Fig. 1.

De acuerdo con un aspecto adicional de esta, la presente invención proporciona el uso de un microorganismo, o una célula transformante o recombinante que se enriquece en la actividad de acetilglutamato sintasa y de acetilornitinasas para producir L-ornitina y L-arginina. En este contexto, la cepa puede ser una que ya resulta capaz de producir L-ornitina o L-arginina antes del refuerzo de acetilglutamato sintasa y acetilornitinasas. El transformante puede prepararse fácilmente por aquellos capacitados en la técnica de acuerdo con cualquier procedimiento de transformación conocido. Según se usa en el presente documento, el término "transformación" se refiere a la modificación genética de una célula que resulta de la toma, incorporación, replicación y expresión de ADN exógeno.

Entre los procedimientos normales de transformación figuran la precipitación de CaCl_2 , el procedimiento Hanahan usando DMSO (dimetilsulfóxido) como un agente reductor tomado como base la precipitación de CaCl_2 , electroporación, precipitación de fosfato de calcio, fusión de plasma, transformación mediada por fibra de carburo de silicio, transformación mediada por agrobacteria, transformación mediada por PEG, el procedimiento de sulfato de dextrano, un procedimiento de lipofectamina, una transformación mediada por secado/supresión.

En la presente invención, por ejemplo, el vector recombinante pEK-Ptrc::1469 se introdujo en un microorganismo huésped mediante electroporación para producir un transformante que se aisló luego usando resistencia por antibiótico.

5 La expresión "potenciado con respecto a la actividad inherente" significa la superioridad de la actividad intracelular de las enzimas acetilglutamato sintasa y acetilornitinasas que se introducen con respecto a la actividad inherente. El refuerzo de actividad enzimática puede lograrse mediante el aumento de copias del gen de interés. El número de copias del gen puede aumentarse mediante el uso de un vector tal como un plásmido, o mediante la integración de un gen adicional en el cromosoma. El refuerzo de un elemento de regulación que tiene un efecto positivo en la expresión del gen puede ser una manera de aumentar el número de copias de genes. El elemento de regulación puede potenciar la actividad del gen en la etapa de transcripción, y puede usarse especialmente para el refuerzo de una señal de transcripción. De manera alternativa, el refuerzo puede lograrse en la etapa de traducción, por ejemplo, aumentando la estabilidad del ARNm. Se puede usar un gen de interés que tiene alta actividad. La sobreexpresión de un gen de interés puede resultar a partir de una modificación en la composición del medio. La actividad del gen puede aumentarse al potenciar el promotor para ello o al usar un promotor más potente. Un ejemplo de un promotor más potente que resulta útil en la presente invención es un promotor Tac (Amann et al). La actividad inherente de un gen puede reforzarse por mutación. La mutación puede inducirse mediante un procedimiento convencional usando luz UV o químicos mutagénicos o mediante un procedimiento de manipulación genética basado en la supresión, inserción y sustitución de residuos nucleótidos. Las medidas que se mencionan anteriormente pueden combinarse para potenciar la actividad de las enzimas.

De las bacterias corineformes, *Corynebacterium* o *Brevibacterium spp.*, se pueden usar en la presente invención. Entre los ejemplos de las cepas de partida adecuadas para la preparación de las variantes de *Corynebacterium glutamicum* transformada se incluyen las siguientes cepas de tipo silvestre: *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, *Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC15806, *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870, *Corynebacterium thermoaminogenaes* FERM BP-1539, *Brevibacterium flavum* ATCC14067, *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869, *Brevibacterium divaricatum* ATCC14020, y variantes de estas que sobreexpresan L-ornitina que carecen de enzimas involucradas en la ruta de biosíntesis de la ornitina, tales como ornitina carbamoyltransferasa, represor de arginina, y glutamato quinasa, y variantes de estas que sobreexpresan L-arginasa que carecen de un represor de arginina involucrado en la biosíntesis de arginina.

De acuerdo con un aspecto adicional de esta, la presente invención proporciona un procedimiento para producir L-ornitina o L-arginina mediante el cultivo de un microorganismo transformado de la presente invención. Para cultivar el microorganismo, deben emplearse medios adecuados y otras condiciones de cultivo bien conocidas en el arte. Aquellos capacitados en la técnica pueden seleccionar fácilmente o modificar de manera adecuada las condiciones de cultivo en base a los microorganismos. Se pueden cultivar de una manera adecuada, por ejemplo, los ejemplos que incluyen, pero sin limitación, cultivo discontinuo, cultivo continuo y cultivo alimentado. Estos procedimientos diversos de cultivo pueden encontrarse en, por ejemplo, "Biochemical Engineering" (James M. Lee, Prentice-Hall International Editions, pp138-176, 1991). El cultivo puede controlarse en cuanto al pH mediante el agregado de un controlador de pH, tales como hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, amoniaco, ácido fosfórico y ácido sulfúrico. Durante el crecimiento de los microorganismos, se puede usar un agente antiespumante tal como un éster poliglicólico de ácido graso con el fin de impedir la formación de espuma. Para mantener el cultivo en una condición aeróbica, el medio puede airearse mediante la introducción de oxígeno o gas contenedor de oxígeno (por ejemplo, aire). El medio de cultivo puede mantenerse a una temperatura de 20 °C a 45 °C y preferiblemente, a una temperatura de 25 °C a 40 °C. En cuanto al período de cultivo, puede extenderse de manera tal que se alcanza un nivel conveniente de metionina L-arginina y puede encontrarse en el orden de 10 a 160 hrs. En la medida que se conoce en el arte, se puede usar cualquier procedimiento normal para aislar L-ornitina o L-arginina a partir del cultivo. Entre los ejemplos de procedimientos de aislamiento se incluyen centrifugación, filtración, cromatografía de intercambio iónico y cristalización. Por ejemplo, luego de la centrifugación a baja velocidad para retirar biomasa, el sobrenadante resultante se somete a cromatografía de intercambio iónico para purificar los aminoácidos de interés.

Efectos ventajosos

55 La presente invención, según se describe anteriormente, proporciona el uso de un polinucleótido derivado de *Corynebacterium glutamicum* que codifica tanto acetilglutamato sintasa como acetilornitinasas para biosíntesis de ornitina o arginina, el uso respectivo de un polipéptido codificado por el polinucleótido, el uso respectivo de un vector recombinante que transporta el polinucleótido, y el uso respectivo de un transformante que se prepara mediante la introducción del vector recombinante en un microorganismo huésped que produce L-arginina, y un procedimiento para producir L-ornitina o L-arginina mediante el cultivo del transformante. Al mostrar mayor actividad de acetilglutamato sintasa y de acetilornitinasas con respecto a la actividad inherente, el transformante es capaz de producir L-ornitina o L-arginina y resulta tener, de este modo, una aplicación útil en la industria biomédica.

65

Descripción de los dibujos

La Figura 1 es un mapa genético que muestra la estructura del vector pEK-Ptrc::Ncgl1469 de acuerdo con la presente invención.

Modo de invención

Se puede lograr una mejor comprensión de la presente invención a partir de los siguientes ejemplos que se establecen para ilustrar, pero que no se deben interpretar como limitantes de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Clonado de Ncgl1469

Se realizó PCR usando los oligonucleótidos de SEQ ID NOS. 3 y 4 como cebadores, con pTrc99A (Amann et al. 1988) que sirvió como modelo, para amplificar un promotor trc útil para la preparación de un vector de sobreexpresión. Por separado, un terminador rrnB se amplificó mediante PCR usando los oligonucleótidos de SEQ ID NOS. 5 y 6, con pTrc99A que sirvió como modelo. El PCR se realizó en presencia de ADN polimerasa de alta fidelidad *PfuUltra*TM (stratagene), con 25 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, renaturalización a 55 °C durante 30 segundos, y extensión a 68 °C durante 1 minuto. La secuencia de nucleótidos de *Ncgl1469* se obtuvo a partir de la base de datos del NIH GenBank. Sobre la base de la secuencia, se designaron un par de cebadores (SEQ ID NOS. 7 y 8). Usando los cebadores sintéticos, se realizó el PCR en el ADN genómico de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, con 25 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, renaturalización a 55 °C durante 30 segundos, y extensión a 68 °C durante 1,5 minutos.

El vector pEKO (vector transportador de *E.coli-C.glutamicum*, Eikmanns et al.1991) se trató con XbaI. Por separado, el promotor ptrc y el 1469 ORF, ambos amplificados anteriormente, fueron digeridos con XbaI, NdeI / NdeI, XbaI, respectivamente y luego ligados al vector digerido para producir un vector recombinante. Este fue doblemente digerido con HincII y EcoRI mientras que la fracción del terminador rrnB amplificada se trató con SmaI/EcoRI, seguido de ligación para producir un vector recombinante en el que una fracción promotor – 1469 ORF – terminador fue insertada.

Ejemplo 2: Sobreexpresión de Ncgl1469

Para examinar la actividad del gen Ncgl1469 clonado en el Ejemplo 1, se necesita, en primer lugar, una mutación de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 en la que se interrumpe argJ. En este contexto, el vector de integración pK18mobsacB (Schafer et al. 1994) se empleó para producir una cepa de argJ interrumpido. Usando dos pares de cebadores (SEQ ID NOS. 7 y 8; 9 y 10), se realizó PCR en el ADN genómico de ATCC13032, con 25 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, renaturalización a 55 °C durante 30 segundos, y extensión a 68 °C durante 1,5 minutos. Los dos productos PCR que se obtuvieron de ese modo se trataron con XbaI/ApaI, y ApaI/XbaI, respectivamente, mientras que el vector pK18mobsacB fue digerido con XbaI. Estos tres digeridos resultantes se ligaron entre sí para producir un vector recombinante.

Mediante electroporación, el vector recombinante se transformó en la cepa ATCC13032 que luego se desarrolló en agar que contenía kanamicina a una concentración de 25 mg/l para discriminar cepas en las que se insertó el gen en el cromosoma a través de recombinación homóloga. La cepa insertada en el cromosoma primario se cultivó en un medio nutritivo con agitación (30 °C, 4 hrs.), seguido del despliegue de la cepa en placas de agar que contenían sucrosa en una concentración diluida diez veces desde 10⁻⁴ a 10⁻¹⁰. La mayoría de las bacterias murieron mientras que una pequeña porción apareció en forma de colonias. La cepa que formó colonias se seleccionó como una cepa conveniente en la que la secuencia del vector insertado en el cromosoma se retiró mediante entrecruzamiento secundario. La cepa se seleccionó finalmente luego de examinarse con respecto a la sensibilidad a la kanamicina y su estructura génica se identificó mediante PCR usando los cebadores de SEQ ID NOS. 7 y 10.

Ejemplo 3: Medición de Ncgl1469 para actividad de acetilglutamato sintasa y acetilornitinasas

La cepa finalmente seleccionada en el Ejemplo 2 se cultivó en un caldo. Luego de cosecharse mediante centrifugación, la masa de células se lavó dos veces con 100 mM de regulador Tris/HCl (pH 7,5) y se sometió a lisis con perlas de vidrio para remover las membranas.

De acuerdo con un procedimiento conocido (Errey and Blanchard, 2005), la actividad del acetilglutamato se determinó mediante la medición del nivel de absorbancia del 5-tio-2-nitrobanzonato a 412 nm. Además, la actividad de la acetilornitinasas se determinó de acuerdo con un procedimiento conocido (Vogel and Mcleelan, 1970).

Las cepas obtenidas mediante la introducción del vector pEKO y del vector pEK-Ptrc::1469 en la cepa ATCC13032, argJΔ fueron inducidas para sobreexpresar el gen de interés, y los resultados se resumen en la Tabla 1, dada a continuación

Tabla 1

Cepa	Plásmido	Actividad específica (unidades/mg de proteína)*	
		Acetilglutamato sintasa ^a	Acetilornitinasas e ^b
<i>C. glutamicum</i> argJ	pEKO	0,03	ND
	pEK-Ptrc::1469	0,17	0,07

* Cuando la cepa que se creó para carecer de argJ, un gen que se conoce porque codifica acetilornitinasas, se indujo para sobreexpresar Ncgl1469, las actividades de tanto la acetilglutamato como de la acetilornitinasas aumentaron, lo que condujo a la conclusión de que el Ncgl1469 codifica ambas enzimas.

Ejemplo 4: Producción de ornitina de cepa SJ8074-pEK-Ptrc::1469

5 Para examinar la productividad de ornitina de la cepa en la que el gen Ncgl1469 fue sobreexpresado, se empleó la cepa productora de ornitina (argF-argR-proBA, Hwang et al. 2008) como una cepa madre.

10 Las cepas fueron cultivadas en un medio que contenía 0,8 g/l de KH₂PO₄, 10 g/l de (NH₄)₂SO₄, 1g/l de MgSO₄·7H₂O, 1,2 g/l de Na₂HPO₄, 2 mg/l MnSO₄·H₂O, 10 mg/l ZnSO₄·7H₂O, 10 g de extracto de levadura, 20g/l de CaCO₃, 60 g/l de glucosa y 10 Mm de IPTG en matraces con deflectores de 250 mL, con agitación. Los niveles de ornitina en el medio se resumieron en la Tabla 2, dada a continuación.

Tabla 2

Cepa	Plásmido	Concentración de L-ornitina (Mg/l) ^a	
		Glutamato (0 mM)	Glutamato (50 mM)
<i>C. glutamicum</i> SJ8074	pEKO	137,57	145,27
	pEK-Ptrc::1469	178,81	207,84

a. Cuando Ncgl1469 fue sobreexpresado en la cepa productora de ornitina, SJ8074, el nivel de producción de ornitina aumentó en aproximadamente el 20 % o más.

15 El transformante preparado mediante la introducción del vector recombinante pEK-Ptrc::Ncgl1469 en *C. glutamicum* SJ8074 se denominó *Corynebacterium glutamicum* CA06-0020 y se depositó el 23 de dic., 2009 en el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (en adelante denominado "KCCM") con el número de acceso KCCM 11057P.

Ejemplo 5: Producción de arginina de la cepa ATCC21831, argRA - pEK-Ptrc::1469

20 Para examinar la productividad de arginina de la cepa de sobreexpresión de TL2, la cepa productora de arginina ATCC21831 se modificó para carecer del represor de arginina argR, y la cepa modificada se usó como una cepa madre.

25 Las cepas fueron cultivadas en un medio que contenía 0,8 g/l de KH₂PO₄, 10 g/l de (NH₄)₂SO₄, 1g/l de MgSO₄·7H₂O, 1,2 g/l de Na₂HPO₄, 2 mg/l MnSO₄·H₂O, 10 mg/l ZnSO₄·7H₂O, 10 g de extracto de levadura, 20g/l de CaCO₃, 60 g/l de glucosa en matraces con deflectores de 250 mL, con agitación. Los niveles de arginina en el medio se resumieron en la Tabla 3, dada a continuación.

Tabla 3

Cepa	Plásmido	Concentración de L-arginina (Mg/l) ^a	
		IPTG (0 mM)	IPTG (50 mM)
ATCC21831 argRA	pEKO	1,42	1,39
	pEK-Ptrc::1469	1,39	1,56

a. Cuando Ncgl1469 fue sobreexpresado en la cepa productora de arginina ATCC21831 argRA, el nivel de producción de arginina aumentó en aproximadamente el 10 %.

El transformante preparado mediante la introducción del vector recombinante pEK-Ptrc::Ncgl1469 en ATCC21831 argRA se denominó *Corynebacterium glutamicum* CA06-0021 y se depositó el 23 de dic., 2009 en el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (en adelante denominado "KCCM") con el número de acceso KCCM 11058P.

A pesar de que las realizaciones preferidas de la presente invención se han divulgado con fines ilustrativos, aquellos capacitados en la técnica apreciarán que son posibles diversas modificaciones, adiciones y sustituciones, sin abandonar el alcance y el espíritu de la invención según se divulga en las reivindicaciones adjuntas.

Aplicación industrial

Según se describe hasta ahora, la presente invención proporciona a el uso de un polinucleótido derivado de *Corynebacterium glutamicum* que codifica tanto acetilglutamato sintasa como acetilornitinasas para biosíntesis de ornitina y arginina, el uso respectivo de un polipéptido codificado por el polinucleótido, el uso respectivo de un vector recombinante que transporta el polinucleótido, el uso respectivo de un transformante que se prepara mediante la introducción del vector recombinante en un microorganismo huésped que produce L-arginina, y un procedimiento para producir L-ornitina o L-arginina mediante el cultivo del transformante. Al mostrar mayor actividad de acetilglutamato sintasa y de acetilornitinasas con respecto a la actividad inherente, el transformante es capaz de producir L-ornitina o L-arginina y resulta tener, de este modo, una aplicación útil en la industria biomédica.

<110> CJ JEILJEDANG CO., LTD.

<120> Variedad de *Corynebacterium glutamicum* que produce L-ornitina o L-arginina y procedimiento para producción de esta

<160> 10

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 203

<212> PRT

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 1

```

Met Ser Pro Thr Val Leu Pro Ala Thr Gln Ala Asp Phe Pro Lys Ile
  1           5           10           15

Val Asp Val Leu Val Glu Ala Phe Ala Asn Asp Pro Ala Phe Leu Arg
          20           25           30

Trp Ile Pro Gln Pro Asp Pro Gly Ser Ala Lys Leu Arg Ala Leu Phe
          35           40           45

Glu Leu Gln Ile Glu Lys Gln Tyr Ala Val Ala Gly Asn Ile Asp Val
  50           55           60

Ala Arg Asp Ser Glu Gly Glu Ile Val Gly Val Ala Leu Trp Asp Arg
  65           70           75           80

Pro Asp Gly Asn His Ser Ala Lys Asp Gln Ala Ala Met Leu Pro Arg
          85           90           95

Leu Val Ser Ile Phe Gly Ile Lys Ala Ala Gln Val Ala Trp Thr Asp
          100          105          110

Leu Ser Ser Ala Arg Phe His Pro Lys Phe Pro His Trp Tyr Leu Tyr
  115          120          125
    
```

ES 2 672 894 T3

Thr Val Ala Thr Ser Ser Ser Ala Arg Gly Thr Gly Val Gly Ser Ala
 130 135 140
 Leu Leu Asn His Gly Ile Ala Arg Ala Gly Asp Glu Ala Ile Tyr Leu
 145 150 155 160
 Glu Ala Thr Ser Thr Arg Ala Ala Gln Leu Tyr Asn Arg Leu Gly Phe
 165 170 175
 Val Pro Leu Gly Tyr Ile Pro Ser Asp Asp Asp Gly Thr Pro Glu Leu
 180 185 190
 Ala Met Trp Lys Pro Pro Ala Met Pro Thr Val
 195 200

<210> 2

5 <211> 612

<212> ADN

<213> *Corynebacterium glutamicum*

10

<400> 2

atgagtccca ccgttttgcc tgctacacaa gctgacttcc ctaagatcgt cgatgttctg 60
 gttgaagcat tcgccaacga tccagcattt ttacgatgga tcccgcagcc ggacccccggt 120
 tcagcaaacg ttcgagcact tttcgaactg cagattgaga agcagtatgc agtggcggga 180
 aatattgatg tcgcgcgtga ttctgagga gaaatcgtcg gcgtcgcgtt atgggatcgg 240
 ccagatggta atcacagtgc caaagatcaa gcagcgatgc tccccggct cgtctccatt 300
 ttcgggatca aggctgcgca ggtggcgtgg acggatttga gttcggctcg tttccacccc 360
 aaattcccc attggtacct ctacaccgtg gcaacatcta gttctgcccg tggaaocgggt 420
 gttggcagtg cgcttcttaa tcacggaatc gctcgcgagg gtgatgaagc tatctatttg 480
 gaggcgacgt cgactcgtgc ggctcaacta tataaccgtc tgggatttgt gcccttgggt 540
 tataccccct cagatgatga tggcactcct gaactggcga tgtggaaacc gccagcgatg 600
 ccaactgttt aa 612

15

<210> 3

<211> 29

20 <212> ADN

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 3

25 ctagtctaga tcatcaccga aacgcgca 29

<210> 4

<211> 34

30

<212> ADN

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 4
 ggaattccat atgtctgttt cctgtgtgaa attg 34
 5 <210> 5
 <211> 31
 <212> ADN
 10 <213> *Corynebacterium glutamicum*
 <400> 5
 cccccggggc tgtttggcg gatgagagaa g 31
 15 <210> 6
 <211> 32
 20 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium glutamicum*
 <400> 6
 25 cggaattcaa aaggccatcc gtcaggatgg cc 32
 <210> 7
 <211> 28
 30 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium glutamicum*
 <400> 7
 35 ctagtctaga tccagttcag gaagcacc 28
 <210> 8
 <211> 27
 40 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium glutamicum*
 <400> 8
 45 nnngggcccg tgtttgctgg ttagggc 27
 <210> 9
 <211> 27
 50 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium glutamicum*
 <400> 9
 55 nnngggccca tgaactcaac gatgctgg 27
 <210> 10
 60 <211> 29
 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium glutamicum*
 65 <400> 10
 ctagtctaga cgagcaagtc gatgtagac 29

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un uso de un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 1 que muestra ambas actividades de acetilglutamasa y acetilornitinasasa para producir L-ornitina y L-arginina.
- 10 2. Un uso de un polinucleótido de SEQ ID NO. 2 que codifica el polinucleótido de la reivindicación 1 que muestra ambas actividades de acetilglutamasa y de acetilornitinasasa para transformar una cepa de *Corynebacterium sp.* Para producir niveles potenciados de L-ornitina o L-arginina.
- 15 3. Un uso de una vector recombinante que contiene el polinucleótido de la reivindicación 2 para generar una cepa transgénica de *Corynebacterium sp.* para potenciar las actividades de acetilglutamato sintasa y de acetilornitinasasa con respecto a la actividad inherente para producir L-ornitina o L-arginina.
- 20 4. Un uso de una cepa de *Corynebacterium sp.* que se transforma con y comprende un vector recombinante que comprende el polinucleótido de SEQ ID N°2 para aumentar la expresión del polinucleótido de la reivindicación 2 para potenciar las actividades de acetilglutamato sintasa y acetilornitinasasa con respecto a la actividad inherente para producir L-ornitina o L-arginina.
- 25 5. El uso de la cepa de *Corynebacterium sp* de acuerdo con la reivindicación 4, en la que la cepa de *Corynebacterium sp.* es *Corynebacterium glutamicum*.
6. Un procedimiento de producción de L-ornitina o L-arginina, que comprende el cultivo de la cepa transgénica *Corynebacterium sp.* de acuerdo con la reivindicación 4 o 5 en un medio; y el recupero de L-ornitina o L-arginina a partir de la cepa y del medio.

FIG. 1

